

**This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

*THIS PAGE BLANK (uspto)*



Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets

AB



⑪ Veröffentlichungsnummer: 0 618 192 A1

⑫

## EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

⑬ Anmeldenummer: 94104676.5

⑭ Anmeldetag: 24.03.94

⑮ Int. Cl. 5: C07D 207/452, G01N 33/53

⑯ Priorität: 29.03.93 DE 4310141

⑰ Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
05.10.94 Patentblatt 94/40

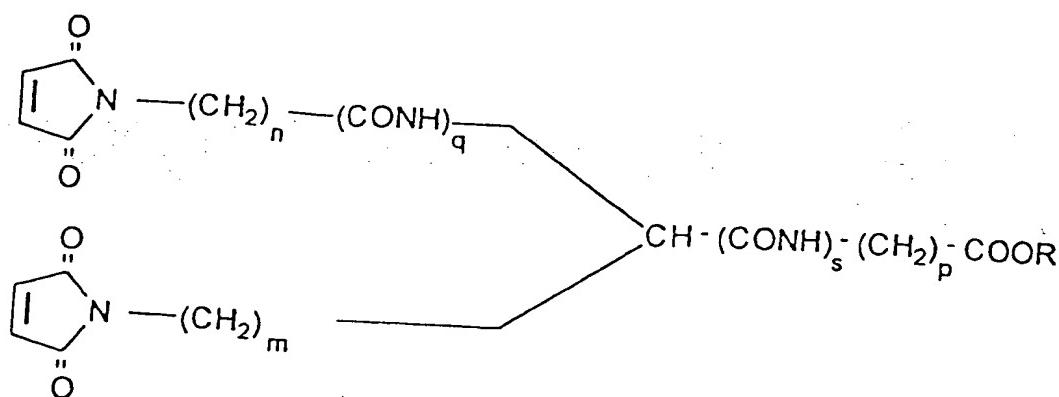
⑲ Benannte Vertragsstaaten:  
AT CH DE ES FR GB IT LI NL SE

⑳ Anmelder: BOEHRINGER MANNHEIM GMBH  
D-68298 Mannheim (DE)

㉑ Erfinder: Hoess, Eva, Dr.  
Am Muehlberg 1A  
D-82319 Starnberg (DE)  
Erfinder: Huber, Erasmus, Dr.  
St. Willibald 10  
D-86923 Finning (DE)  
Erfinder: Markert-Hahn, Christine Dr.  
Herzogstandstrasse 2A  
D-82402 Seeshaupt (DE)  
Erfinder: Ofenloch-Haehnle, Beatus, Dr.  
Kreuzbergstrasse 1  
D-82407 Wielenbach (DE)

㉒ Homobidentale, trifunktionelle Maleimid-Linker, und ihre Verwendung in immunologisch aktiven Konjugaten.

㉓ Verbindung der allgemeinen Formel



in der R eine esteraktivierende Gruppe

m und n gleich oder verschieden und 0 - 6, p 0, 2 - 4 und q und s 1, p = 0, wenn s = 0 ist und p = 2 - 4 wenn s = 1 ist, darstellen, sind neu und zur reproduzierbaren Kopplung von immunologischen Substanzen bei hoher Ausbeute geeignet.

*THIS PAGE BLANK (USPTO)*

Die Erfindung betrifft homobidentale, trifunktionelle Linker, ihre Herstellung und Verwendung zur Herstellung von immunologisch aktiven Substanzen (z. B. Immunogenen, markierten Antikörperkonjugaten) und zur Kopplung von immunologisch aktiven Substanzen aneinander oder an Trägersubstanzen, wie beispielsweise an Proteine oder andere Polymere.

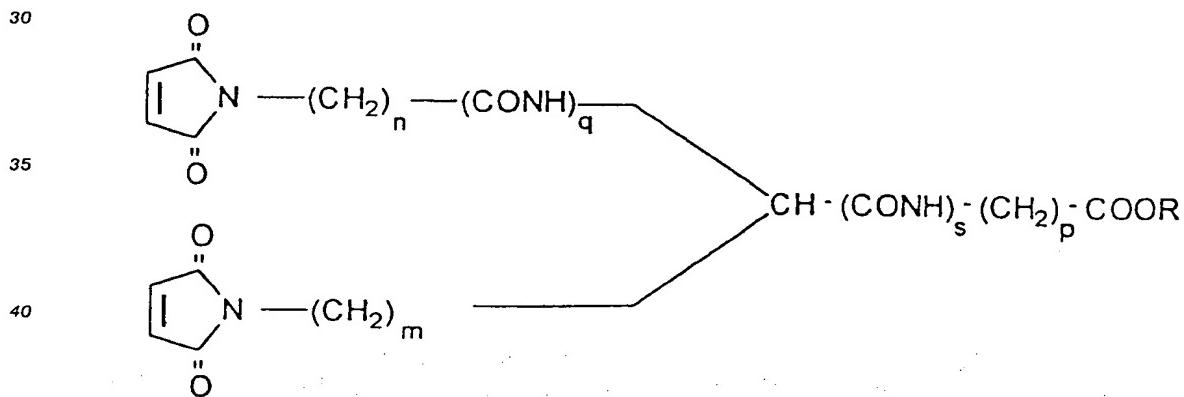
Die Kopplung von immunologisch aktiven Substanzen an Trägerproteine bzw. an in einem Immunoassay nachweisbare Markierungen, erfolgt mit bifunktionellen Linkern oder, wenn mehr als zwei Moleküle verknüpft werden sollen oder zur Bindung eines Moleküls zwei Bindungsstellen erforderlich sind, auch mit trifunktionellen Linkern. So wird beispielsweise im US-Patent Nr. 5,082,930 ein trifunktioneller Linker beschrieben, mit dem Antikörper an radioaktive Metallionen gekoppelt werden können. Dabei wird ein Antikörper kovalent an eine Funktion des Linkers gebunden, während ein radioaktives Metallion über die beiden anderen Funktionen des Linkers in Form eines Chelatkomplexes gebunden wird.

Aus der EP-A 0 310 361 sind trifunktionelle Konjugate bekannt, in denen mindestens zwei der Linkerfunktionen an kleine Moleküle gebunden sind. Länge und chemischer Aufbau der drei Linkerarme sind so beschaffen, daß eine immunologische Bindung von mehreren Antikörpern an diese kleinen Moleküle sterisch behindert werden. Auf Basis dieser Behinderung kann ein Immunoassay durchgeführt werden.

Aus der EP-A 0 446 071 sind ebenfalls trifunktionelle Linker bekannt, deren drei Kopplungsfunktionen identisch sind und jeweils die Maleinimidogruppe darstellen. Mit diesen homotrifunktionellen Linkern können beispielsweise drei Antikörper oder Antikörperfragmente oder auch zwei Antikörper miteinander verbunden werden, wobei in letzterem Fall einer der Antikörper über zwei seiner Thiolgruppen an den trifunktionellen Linker gebunden wird.

Bei der Umsetzung von Proteinen mit solchen homotrifunktionellen Linkern erfolgen jedoch unerwünschte, nicht kontrollierbare Vernetzungen, da die Kupplung der einzelnen Reaktionspartner miteinander in einem Reaktionsschritt durchgeführt werden muß.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es daher, homobidentale, trifunktionelle Linker zur Verfügung zu stellen, mit denen reproduzierbar und in hoher Ausbeute thiolgruppenhaltige Verbindungen mit Proteinen, Polymeren und Hapteten gekoppelt werden können. Diese Aufgabe wird gelöst durch eine Verbindung der allgemeinen Formel

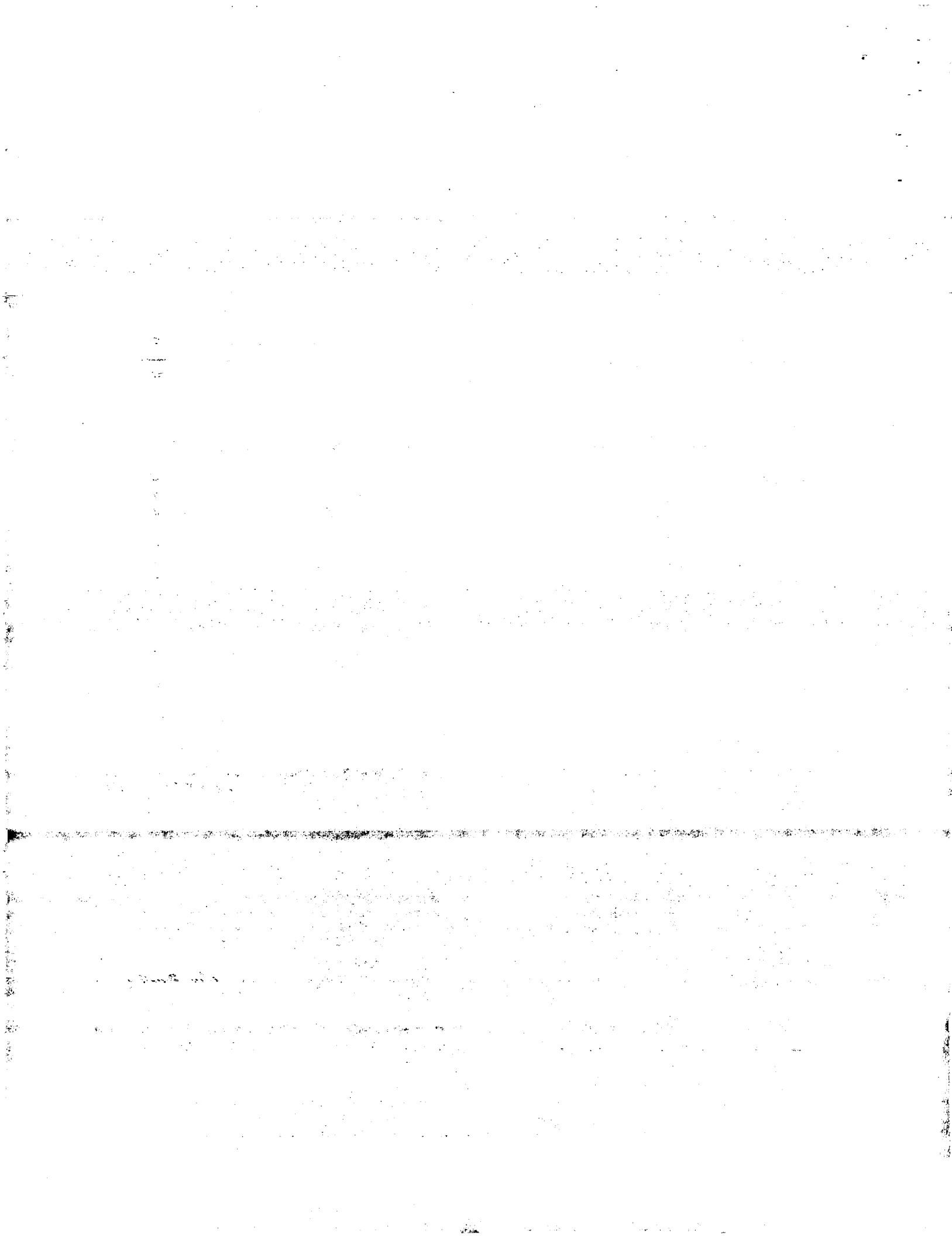


in der R eine esteraktivierende Gruppe, m und n gleich oder verschieden und 0 - 6, q und s 0 oder 1, p = 0, wenn s = 0 ist und p = 2 - 4, wenn s = 1 ist, darstellen.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen sind neu. Ihre Herstellung ist nicht durch Analogieverfahren durchführbar.

Es hat sich gezeigt, daß mit derartigen Verbindungen eine stabile Kopplung zwischen Hapteten, Proteinen und/oder Polymeren, wie beispielsweise Dextranen, ermöglicht wird und die mit den erfindungsgemäßen Verbindungen hergestellten Konjugate in hoher Ausbeute erhältlich sind. Die Kopplungsausbeute kann nach dem Fachmann geläufigen Methoden (z. B. über die Bestimmung der Anzahl SH-Gruppen im Konjugat nach G.L. Ellman, Arch. Biochem. Biophys. 74 (1958) 443 - 450 oder P.W. Riddles, Anal. Biochem. 94 (1979) 75 - 81 bestimmt werden).

Als esteraktivierende Gruppe R werden bevorzugt N-Hydroxyestergruppen (wie z. B. die Hydroxysuccinimidylgruppe), Imidazolide, Pyridazolide, Aminoalkylcarbonsäuren oder aktivierte Arylestergruppen (z. B. p-Nitrophenylester) verwendet. n, m, p, q und s können im Rahmen der Erfindung alle genannten Werte annehmen. Es hat sich jedoch gezeigt, daß zur Kopplung großer Haptene insbesondere langkettige Linker



geeignet sind.

Besonders bevorzugt sind Verbindungen, in denen

- a) R: Hydroxysuccinimidyl,
- n = 5, m = 4, p = 2 und q und s = 1 bedeuten und Verbindungen,
- 5 b) R: Hydroxysuccinimidyl,
- n und m = 5, p = 0 und q und s = 0 bedeuten.
- c) R: Hydroxysuccinimidyl
- n und m = 3, p = 0, q und s = 0
- d) R: Hydroxysuccinimidyl

10 n = 5, m = 4, p = 0, q = 1, s = 0

Bevorzugt werden die erfindungsgemäßen Linker zur Kopplung von immunologisch aktiven Substanzen, wie Antikörper und Antikörperfragmente, mit Haptenen, Proteinen und Dextran verwendet.

Derartige Kopplungsprodukte können vorteilhaft als Immunogene verwendet werden, da dabei die Kopplung einer doppelten Anzahl von Haptenen an ein Trägerprotein möglich ist. Besonders gute Immunantworten werden nämlich erhalten, wenn das verwendete Immunogen hinreichend hoch mit Hapten beladen ist.

Es ist zudem vorteilhaft, wenn das Immunogen einen basischen pH-Wert hat (A. Muckerheide et al., J. Immunol. 138 (1987) 833; R.J. Apple et al., J. Immunol. 140 (1987) 3290; P.L. Domen, J. Immunol. 139 - (1987) 3195). Eine Möglichkeit, den isoelektrischen Punkt zu erhöhen, ist die Einführung von zusätzlichen 20 Aminogruppen in Trägerproteine (EP 0 462 669; A. Muckerheide et al., J. Immunol. 138 (1987), 2800; Pierce Supercarrier 77150). In einem zweiten Schritt erfolgt dann erst die Aktivierung mit Maleimid- bzw. Mercaptogruppen.

Mit den erfindungsgemäßen Linkern ist es jedoch möglich, eine hinreichend hohe Immunogenbeladung zu erhalten, ohne jedoch alle Aminogruppen des Proteins zu derivatisieren. Über die bei der Reaktion 25 verfügbaren Mengen an Protein kann der Einbau an erfindungsgemäßen Linkern gesteuert werden.

In Immunoassays wird durch den Hapten-Beladungsgrad der Konjugate die Sensitivität entscheidend mitbeeinflußt, so auch bei der Detektion von hochmolekularen Analyten im CEDIA-Prinzip (EP-A 0 497 613). Die Detektion niedrigkonzentrierter Analyten kann nur mit hochbeladenen Antikörper-ED-Konjugaten (ED = Enzymdonor der  $\beta$ -Galactosidase) erfolgen. Die Beladung ist aber durch die Zahl der zugänglichen 30 Aminogruppen des Antikörpers oder Antikörperfragments beschränkt. Durch die erfindungsgemäßen homobidentalen, trifunktionellen Linker kann ohne Vernetzung der Antikörper der Einbau verdoppelt und so die Sensitivität gesteigert werden.

So ist es bevorzugt, zwei ED-Untereinheiten von  $\beta$ -Galactosidase oder zwei Haptene über die beiden 35 Maleimidgruppen der erfindungsgemäßen Linker an einen Antikörper oder ein Antikörperfragment oder ein Dextran, welcher oder welches über die aktivierte Gruppe R an den erfindungsgemäßen Linker gebunden ist, zu koppeln. In weiteren bevorzugten Konjugaten sind zwei Haptene über die beiden Maleimidgruppen der erfindungsgemäßen Linker an eine ED-Untereinheit, die über die aktivierte Gruppe R an den erfindungsgemäßen Linker gebunden ist, gekoppelt.

Verfahren zur Aktivierung und Kopplung von Haptenen, Proteinen sowie Antikörpern sind dem Fachmann 40 geläufig. Die Herstellung von Maleimidderivaten und ihre Kopplung mit SH-Gruppen ist beispielsweise bei O. Keller, Helvetica Chimica Acta 58 (1975) 531 - 541 beschrieben. Säureamide können beispielsweise nach der EP-A 0 029 909 hergestellt werden. Die Aminierung von Proteinen kann beispielsweise nach der EP-A 0 462 669 erfolgen.

Die Synthese von erfindungsgemäßen Linkern, in denen q = 0 und s = 0 sind, kann durchgeführt 45 werden durch zweifache Malonester-Synthese mit N-Phtalimidoalkylhalogeniden (vorzugsweise Bromid) an Malondiester (vorzugsweise Malondi-t-butylester). Es wird dabei ein Dialkylmalondiester erhalten. Nach Spaltung des Malondiesters in sauren (vorzugsweise mit Trifluoressigsäure) tritt beim Erwärmen Decarboxylierung (Säurespaltung) auf. Anschließend können durch Behandlung mit Hydrazin oder durch saure Hydrolyse die Aminogruppen freigesetzt werden. Durch Behandlung mit Alkoxy carbonylmaleimid (bevorzugt Methoxy-oder Ethoxycarbonylmaleimid (O. Keller, loc. cit.)) werden die beiden Maleimidreste eingeführt. Im weiteren wird die Carboxylfunktion nach dem Fachmann bekannten Methoden, beispielsweise mit Dicyclohexylcarbodiimid (DCCI) und N-Hydroxysuccinimid, aktiviert. Durch zusätzliche Umsetzung des 50 aktivierten Esters mit  $\omega$ -Aminocarbonsäuren (z. B.  $\beta$ -Alanin, U-Aminocapronsäure) und anschließender Aktivierung, beispielsweise mit DCCI und N-Hydroxysuccinimid, können erfindungsgemäße Linker mit q = 0 und s = 1 erhalten werden. Es wird dadurch ein erfindungsgemäßer Linker erhalten, der zwei Maleimidreste und eine Hydroxysuccinimidesterfunktion als R enthält. Andere Reste R können eingeführt werden, indem die Carboxylfunktion nach dem Fachmann bekannten Methoden derivatisiert wird.

Die Synthese von erfindungsgemäßen Linkern mit  $q$  und  $s = 1$  kann durchgeführt werden durch Umsetzung einer Diaminosäure, wobei eine der Aminofunktionen durch eine säurelabile Schutzgruppe (vorzugsweise t-Butyloxycarbonyl) geschützt ist, mit Alkoxy carbonylmaleinimiden, bevorzugt mit Methoxy- oder Ethoxycarbonylmaleinimid (O. Keller, loc. sit.). Anschließend wird die erhaltene Verbindung an der freien Carboxyfunktion mit einer Aminosäure umgesetzt.

Handelt es sich um eine  $\alpha$ -Diaminocarbonsäure, wird das Molekül zweckmäßig entweder mit einer  $\omega$ -Aminocarbonsäure (vorzugsweise  $\beta$ -Alanin) oder bereits einer entsprechend Amino-derivatisierten zu koppelnden Verbindung wie einem Hapten (vorzugsweise einem Biotin-Derivat) verknüpft. Die Kupplung der Aminogruppe an die freie Carboxygruppe erfolgt nach dem Fachmann bekannten Kupplungsmethoden (bevorzugt mit Carbodiimiden und N-Hydroxysuccinimid).

Nach Abspaltung der Schutzgruppe unter sauren Bedingungen (z. B. mit Trifluoressigsäure oder 2 N Chlorwasserstoff in Dioxan) wird die erhaltene Verbindung mit einer Carboxyaktivierten Maleinimidoalkansäure (vorzugsweise Maleinimidohexanoxyl-N-hydroxysuccinimid) umgesetzt. Die Aktivierung der freien Carbonylfunktion erfolgt nach dem Fachmann bekannten Methoden, beispielsweise mit Morpholinoethylisocyanid und N-Hydroxysuccinimid.

Die Synthese von erfindungsgemäßen Linkern mit  $q = 1$  und  $s = 0$  kann analog ausgehend von Diaminosäuren durchgeführt werden, wobei im ersten Schritt keine der Aminogruppen durch eine Schutzgruppe geschützt wird.

Die Aktivierung von Proteinen mit trifunktionellen Linkern kann durch nucleophile Substitution der N-Hydroxysuccinimid-Funktion des Linkers durch die  $\epsilon$ -Aminogruppe der Lysinseitenketten von Proteinen in leicht alkalischem Puffer erfolgen. Hierzu wird ein 1 - 8facher Überschuß an Linker, bezogen auf die zu derivatisierenden Aminogruppen des Proteins, verwendet. Durch Dialyse oder Gelchromatographie wird das bei der Reaktion gebildete N-Hydroxysuccinimid und der überschüssige Linker abgetrennt.

Aminogruppenhaltige Haptene können entweder in organischen Medien, wie Dioxan oder DMF unter Zusatz von Triethylamin oder in Puffergemischen, bevorzugt Kaliumphosphatpuffer, pH 7,5, mit äquimolaren Mengen erfindungsgemäßem Linker umgesetzt werden.

Die Bestimmung des Proteingehalts in Lösung (zur Ermittlung der Ausbeute der Umsetzung) kann beispielsweise mit dem "BCA protein assay test" von Pierce Chemicals (Bestell-Nr. 23225) erfolgen. (P.K. Smith, Anal. Biochem. 150 (1985) 76 - 85)

Die Bestimmung des Beladungsgrades von Maleinimido funktionalisierten Proteinen erfolgt vorzugsweise mit "Ellmans-Reagenz" (5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoësäure)). Zur Konjugatsynthese werden beispielsweise SH-aktivierte Haptene und Maleinimido-aktivierte Proteine in der Weise umgesetzt, daß das SH-aktivierte Hapten unter Schutzgasatmosphäre (z. B. Argon) in Kaliumphosphatpuffer im leicht Sauren mit einem Maleinimido-funktionalisierten Protein zur Reaktion gebracht wird. Das Hapten wird dabei unter Ausbildung einer Thioetherbindung an das Protein gebunden. Die Menge des einzusetzenden SH-aktiven Haptens richtet sich nach der Zahl der Maleinimidogruppen des verwendeten Konjugats aus Protein und Linker. Um vollständigen Umsatz zu erzielen, hat sich ein Beladungsangebot von 2:1 als Verhältnis von SH:Maleinimidogruppen bewährt.

Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele näher erläutert:

#### Beispiel 1

##### 1.1 N- $\alpha$ -Boc- $\epsilon$ -maleinimido- $\alpha$ -aminohexansäure ( $\alpha$ -Boc- $\epsilon$ -Mal-Lys)

3.70 g (15 mmol)  $\alpha$ -t-Butyloxycarbonyl-Lysin werden in 200 ml ges. Natrium-hydrogen-carbonat-Lösung aufgenommen, mit 2.54 g (15 mmol) N-Ethoxycarbonyl-maleinimid versetzt und 30 min bei 20 °C gerührt. Anschließend wird die Reaktionslösung mit 200 ml Wasser verdünnt, mit 2 N Salzsäure auf pH 1.8 gestellt, zweimal mit je 200 ml Essigester extrahiert, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Wasserstrahlvakuum abdestilliert. Das Rohprodukt wird mittels offener Säulenchromatographie (5 x 50 cm) über Kieselgel, Eluent Essigester/Methanol (v/v 4/1)/1 % Essigsäure, aufgereinigt. Die Fraktionen, die Produkt enthalten, werden vereinigt, das Lösungsmittel im Wasserstrahlvakuum entfernt und der Rückstand im Hochvakuum über  $\text{CaCl}_2$  getrocknet.

Ausbeute: 3.8 g (11.58 mmol) 78 % d.Th.  
DC: Kieselgel (Merck 60), Essigester/Methanol (v/v 3/2)/1% Essigsäure, Detektion mit Kaliumpermanganat

$R_f = 0.83$

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_6\text{-DMSO/TMS}$ ):  $\delta = 1.35$  (m, 15H,  $^1\text{Bu}$  u. 3  $\text{CH}_2$ ); 3.35 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{-N}$ ); 3.66 (m, 1H,  $\text{CH}\text{-N}$ ); 6.18 (d, br, 1H,  $\text{NH}$ ,  $J=7.2$  Hz); 6.98 ppm (s, 2H,  $\text{CH} =$ ).

**1.2 N- $\alpha$ -Boc- $\epsilon$ -maleinimido- $\alpha$ -aminohexanoyl- $\beta$ -alanin ( $\alpha$ -Boc- $\epsilon$ -Mal-Lys- $\beta$ -Ala)**

- 1.60 g (4.9 mmol) der Verbindung aus Beispiel 1.1 in 200 ml THF werden mit 676 mg (5.92 mmol) N-Hydroxysuccinimid und 1.21 g (5.92 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid versetzt und 1 h bei 20 °C gerührt. 480 mg (5.4 mmol)  $\beta$ -Alanin werden in 200 ml 0.1 M KPO<sub>4</sub>-Puffer pH 8.5 gelöst und zum Reaktionsansatz getropft. Nach weiteren 16 h Röhren bei 20 °C wird das organische Lösungsmittel im Wasserstrahlvakuum abdestilliert, die wässrige Phase mit 100 ml Wasser verdünnt, zweimal mit je 250 ml Essigester extrahiert, über Magnesiumsulfat getrocknet und im Wasserstrahlvakuum eingeengt. Der Rückstand wird über eine Kieselgelsäule (5 x 30 cm), Eluent Essigester/Methanol (v/v 4/1)/1 % Essigsäure aufgereinigt.
- Ausbeute: 1.17 g (2.96 mmol) 61 % d.Th.  
DC: Kieselgel (Merck 60), Essigester/Methanol (v/v 4/1)/1 % Eisessig, Detektion mit Kaliumpermanganat R<sub>f</sub> = 0.7  
<sup>1</sup>H-NMR (D<sub>6</sub>-DMSO/TMS):  $\delta$  = 1.35 (m, 15 H, <sup>1</sup>Bu u. 3 CH<sub>2</sub>); 2.32 (t, 2H, CH<sub>2</sub>CO, J = 6.9 Hz); 3.16-3.41 (m, 4H, CH-N); 3.88 (m, 1H, CH-N); 6.73 (d, 1H, NH-COO, J = 7.7 Hz); 6.98 (s, 2H, CH=); 7.78 ppm (t, 1H, NH-CO, J = 5.4 Hz).

**1.3  $\epsilon$ -Maleinimido- $\alpha$ -aminohexanoyl- $\beta$ -alanin ( $\epsilon$ -Mal-Lys- $\beta$ -Ala)**

- 710 mg (1.8 mmol) der Verbindung aus Beispiel 1.2 werden bei 0 °C unter Röhren mit 15 ml Trifluoressigsäure versetzt, langsam auf 20 °C erwärmt. Nach 30 min wird mit 15 ml Essigester verdünnt, weitere 15 min bei 20 °C gerührt, das Lösungsmittel im Wasserstrahlvakuum abdestilliert und der Rückstand aus Dioxan/Wasser (v/v 1/1) lyophilisiert.  
Ausbeute: 430 mg (1.5 mmol) 81 % d.Th.  
DC: Kieselgel (Merck 60), Essigester/Methanol (v/v 1/4)/1 % Eisessig, Detektion mit Ninhydrin R<sub>f</sub> = 0.33  
<sup>1</sup>H-NMR (D<sub>6</sub>-DMSO/TMS):  $\delta$  = 1.15-1.64 (m, 6H, 3 CH<sub>2</sub>); 2.41 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-CO, J = 6.6 Hz); 3.37 (m, 4H, 2 CH<sub>2</sub>-N); 3.68 (m, 1H, CH-N); 7.00 (s, 2H, CH=); 8.53 ppm (t, 1H, NH-CO, J = 6.0 Hz).

**1.4 N- $\alpha$ -(6-Maleinimidohexanoyl)- $\epsilon$ -maleinimido- $\alpha$ -aminohexanoyl- $\beta$ -alanin ( $\alpha$ -MHS- $\epsilon$ -Mal-Lys- $\beta$ -Ala)**

- Zu einer Lösung aus 400 mg (1.35 mmol) der Verbindung aus Beispiel 1.3 in 10 ml 0.1 M KPO<sub>4</sub>-Puffer pH 7.5 wird unter Röhren eine Lösung aus 462 mg (1.5 mmol) Maleinimidohexansäure-N-hydroxysuccinimidester (MHS) in 10 ml THF getropft. Der pH-Wert wird bis zur Konstanz mit 1 N Natronlauge auf pH 7.5 nachgestellt. Nach 16 stündigem Röhren bei 20 °C wird das organische Lösungsmittel im Wasserstrahlvakuum abdestilliert, der Rückstand mit 10 ml Wasser verdünnt und mit 1 N Salzsäure auf pH 3.0 gestellt und dreimal mit je 30 ml Essigester extrahiert - das Produkt geht in die organische Phase über. Diese wird mit Magnesiumsulfat getrocknet und im Wasserstrahlvakuum eingeengt. Der Rückstand wird mittels offener Säulenchromatographie über Kieselgel, Eluent Essigester/Methanol (v/v 2/1)/1 % Essigsäure, gereinigt, die gepoolten Fraktionen eingedampft und aus 10 ml Essigester/THF (v/v 1/1) mit Diisopropylether ausgefällt. Der Niederschlag wird abfiltriert und im Hochvakuum über CaCl<sub>2</sub> getrocknet.
- Ausbeute: 230 mg (0.47 mmol) 35 % d.Th.  
DC: Kieselgel (Merck 60), Essigester/Methanol (v/v 2/1)/1 % Eisessig, Detektion mit Kaliumpermanganat R<sub>f</sub> = 0.63  
<sup>1</sup>H-NMR (D<sub>6</sub>-DMSO/TMS):  $\delta$  = 1.14-1.50 (m, 12H, 6 CH<sub>2</sub>); 2.09 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-CO, J = 6.6 Hz); 2.22 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-CO, J = 7.5 Hz); 3.37 (m, 6H, CH<sub>2</sub>-N); 4.07 (m, 1H, CH-N); 7.00 (s, 2H, CH=); 7.85 ppm (m, 2H, NH-CO).

**1.5 N- $\alpha$ -(6-Maleinimidohexanoyl)- $\epsilon$ -maleinimido- $\alpha$ -aminohexanoyl- $\beta$ -alanyl-(N-hydroxysuccinimid) ( $\alpha$ -MHS- $\epsilon$ -Mal-Lys- $\beta$ -Ala-OSu)**

- 180 mg (0.36 mmol) der Verbindung aus Beispiel 1.4 werden in 10 ml absolutem DMF gelöst, mit 49 mg (0.43 mmol) N-Hydroxysuccinimid und 60  $\mu$ l (0.43 mmol) Morpholinoethylisocyanid (MEI) versetzt und 16 h bei 20 °C gerührt, wobei nach jeweils 8 h noch zweimal 49 mg (0.43 mmol) N-Hydroxysuccinimid und 60  $\mu$ l (0.43 mmol) MEI nachdosiert werden. Zur vollständigen Umsetzung wird noch weitere 6 h gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel im Hochvakuum entfernt, der Rückstand mit 25 ml Essigester digeriert, Unlösliches abfiltriert und das Filtrat auf ca. 10 ml eingeengt. Das in wenig Essigester gelöste Produkt wird zu 200 ml Diisopropylether getropft, der Niederschlag abgetrennt, mit Diisopropylether gewaschen und im Trockenschränk mit CaCl<sub>2</sub> getrocknet.  
Ausbeute: 115 mg (0.20 mmol) 56 % d.Th.

DC: Kieselgel (Merck 60), Essigester/Methanol (v/v 2/1)/1 % Eisessig, Detektion mit Kaliumpermanganat  $R_f = 0.83$

<sup>5</sup> <sup>1</sup>H-NMR ( $D_6$ -DMSO/TMS):  $\delta = 1.06$ - $1.50$  (m, 12 H, 6  $CH_2$ ); 2.08 (t, 2H,  $CH_2CO$ ,  $J = 6.7$  Hz); 2.50 (t, 2H,  $CH_2COOSu$ ); 2.81 (s, 4H, 2  $CH_2COO$ ); 3.31 (m, 6H, 3  $CH_2N$ ); 4.12 (m, 1H,  $CH-NH$ ); 6.98 (s, 4H,  $CH=$ ); 7.81 (d, 1H,  $NHCH$ ,  $J = 7.0$  Hz); 8.03 ppm (t, br, 1H,  $NHCH_2$ ).

### Beispiel 2

#### 2.1 N- $\alpha$ -Boc- $\epsilon$ -Maleinimido- $\alpha$ -aminoxyhexanoyl-DADOO-Biotin ( $\alpha$ -Boc- $\epsilon$ -Mal-Lys-DADOO-Biotin)

<sup>10</sup> Zu einer Lösung aus 1.00 g (3.06 mmol) Verbindung aus Beispiel 1.1 in 50 ml THF werden unter Röhren 422 mg (3.67 mmol) N-Hydroxysuccinimid und 757 mg (3.67 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid zugegeben. Nach 1 stündigem Röhren bei 20 °C tropft man eine Lösung aus 1.37 g (3.67 mmol) Biotin-DADOO in 50 ml 0.1 M  $KPO_4$ -Puffer pH 8.5 zu. Der Ansatz wird nach weitere 2 h bei 20 °C gerührt, anschließend das organische Lösungsmittel im Wasserstrahlvakuum entfernt und die wässrige Phase lyophilisiert. Das Rohprodukt wird durch Kieselgelchromatographie, Eluent Essigester/Methanol (v/v 2/1)/1 % Essigsäure, aufgereinigt.

Ausbeute: 930 mg (1.36 mmol) 44 % d.Th.

<sup>20</sup> DC: Kieselgel (Merck 60), Essigester/Methanol (v/v 2/1)/1 % Eisessig, Detektion mit Biotinspray und Kaliumpermanganat  $R_f = 0.44$

<sup>1</sup>H-NMR ( $D_6$ -DMSO/TMS):  $\delta = 1.10$ - $1.90$  (m, 15H,  $^1Bu$  u. 6  $CH_2$ ); 2.06 (t, 2H,  $CH_2CO$ ,  $J = 6.7$  Hz); 2.60-2.90 (m, 3H,  $CHS$  u.  $CH_2S$ ); 3.00-3.60 (m, 14H, 3  $CH_2N$  u. 4  $CH_2O$ ); 3.77 (m, 1H,  $CHNH$ -Lys); 4.14 (dd, 1H,  $CH-NH$ -Biotin); 4.30 (dd, 1H,  $CHNH$ -Biotin); 6.39 (m, 2H,  $NH$ -Biotin); 6.76 (d, 1H,  $NHCOO$ ,  $J = 7.1$ ); 6.99 (s, 2H,  $CH=$ ); 7.84 ppm (t, br, 2H, 2  $NHCO$ ).

<sup>25</sup> 2.2  $\epsilon$ -Maleinimido- $\alpha$ -aminoxyhexanoyl-DADOO-Biotin ( $\epsilon$ -Mal-Lys-DADOO-Biotin) 9

<sup>30</sup> 500 mg (0.7 mmol) Verbindung aus Beispiel 2.1 werden bei 0 °C mit 10 ml Trifluoressigsäure versetzt und langsam auf 20 °C erwärmt. Nach 30 min wird mit 10 ml Essigester verdünnt und weitere 15 min gerührt. Das Lösungsmittel wird im Wasserstrahlvakuum entfernt und der Rückstand aus Dioxan/Wasser (v/v 1/1) lyophilisiert.

Ausbeute: ca. 0.7 mmol

<sup>35</sup> DC: Kieselgel (Merck 60) Essigester/Methanol (v/v 1/1)/1 % Eisessig, Detektion mit Biotinspray, Kaliumpermanganat und Ninhydrin  $R_f = 0.08$

2.3 N- $\alpha$ -Maleinimidohexanoyl- $\epsilon$ -Maleinimido- $\alpha$ -aminoxyhexanoyl-DADOO-Biotin ( $\alpha$ -MHS- $\epsilon$ -Mal-Lys-DADOO-Biotin, MALOS-Biotin)

<sup>40</sup> 0.7 mmol Verbindung aus Beispiel 2.2 werden in 10 ml 0.1 M  $KPO_4$ -Puffer pH 7.5 gelöst und mit 260 mg (0.84 mmol) Maleinimidohexansäure-N-hydroxysuccinimid (MHS) in 10 ml THF versetzt. Der pH-Wert wird mit 1 N Natronlauge solange auf pH 7.5 nachgestellt bis keine pH-Wert Änderung mehr zu beobachten ist. Nach 16 h Röhren bei 20 °C wird das organische Lösungsmittel im Wasserstrahlvakuum entfernt und der Rückstand lyophilisiert. Die Aufreinigung des Rohprodukts erfolgt durch offene Säulenchromatographie an Kieselgel, Eluent Essigester/Methanol (v/v 1/1)/1 % Essigsäure. Die gepoolten Fraktionen werden im Wasserstrahlvakuum eingeengt, der Rückstand in Dioxan aufgenommen, Ungelöstes abfiltriert und lyophilisiert.

Ausbeute: 500 mg (enthält noch Dioxan und Essigsäure)

<sup>45</sup> DC: Kieselgel (Merck 60), Essigester/Methanol (v/v 1/1)/1 % Eisessig, Detektion mit Biotinspray und Kaliumpermanganat  $R_f = 0.55$

<sup>50</sup> <sup>1</sup>H-NMR ( $D_2O$ -TMS-Na-Salz):  $\delta = 1.20$ - $1.80$  (m, 18 H, 9  $CH_2$ ); 2.22 (m, 4H, 2  $CH_2CO$ ); 2.71-2.90 (m, 3H,  $CHS$  u.  $CH_2S$ ); 3.38-3.75 (m, 16 H, 4  $CH_2N$  u. 4  $CH_2O$ ); 4.20 (m, 1H,  $CHNH$ -Lys); 4.44 (dd, 1H,  $CHNH$ -Biotin); 4.60 (dd, 1H,  $CHNH$ -Biotin); 6.88 ppm (s, 4H,  $CH=$ ).

Beispiel 3

Aktivierung von Proteinen mit erfindungsgemäßen Linkern

5    3.1 Aktivierung von KLH

- 150 mg ( $5 \times 10^{-5}$  mmol/l) Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) werden in 5 ml 0,1 mol/l Kaliumphosphat/0,05 mol/l Natriumchloridpuffer, pH 8,5 gelöst und mit  $5 \times 10^{-2}$  mmol/l erfindungsgemäßem Linker (Beispiel 1.5) in 2,5 ml Dioxan versetzt. Nach 60 Minuten Röhren bei 20 °C wird der pH-Wert mit 0,1 mol/l Natronlauge, pH 8,5 eingestellt und weitere drei Stunden bei 20 °C gerührt. Die Aufreinigung erfolgt durch Gelchromatographie an einer ACA 202-Säule 40 x 3 cm, Eluent: 0,1 mol/l Kaliumphosphat/0,05 mol/l Natriumchloridpuffer, pH 7,0).

10    3.2 Aktivierung von POD mit erfindungsgemäßen Linkern

- 75    Die Aktivierung erfolgt in einem molaren Überschuß des Linkers (Beispiel 1.5) zu POD von 25 : 1. POD wird mit einer Konzentration von 25 mg/ml in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 150 mM NaCl gelöst. Die entsprechende Menge Linker wird in DMSO vorgelöst mit 100 mg/ml. Von dieser Lösung werden 92 µl/ml POD zur POD-Lösung gegeben. Der pH des Ansatzes wird nachkontrolliert und auf 7,0 gestellt.
- 20    Anschließend wird der Ansatz unter Röhren 1 h 25 °C inkubiert. Beendigung der Reaktion erfolgt durch pH-Änderung auf 6,1 und Abkühlung des Ansatzes im Eisbad. Anschließend wird der nicht gekoppelte Linker durch fließende Dialyse gegen 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,1, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA abgetrennt. Der Einbau der MH-Gruppen wird bestimmt durch Reaktion mit einer definierten Menge an Cystein und Titration der Restmenge an Cystein mit Dithiodipyridin.

25    Beispiel 44.1 Bis(3-phthalimidopropyl)malonsäuredimethylester

- 30    1.14 ml (10 mmol) Malonsäuredimethylester und 8,04 g (30 mmol) n-(3-Brompropyl)phthalimid werden unter Stickstoffatmosphäre in 50 ml absolutem Tetrahydrofuran gelöst. Bei 25 °C werden 0,24 g (10 mmol) Natriumhydrid zugegeben. Die Mischung wird 8 - 10 h unter Rückfluß erhitzt. Nach dem Abkühlen werden weitere 0,24 g (10 mmol) Natriumhydrid zugegeben und nochmals 20 - 72 h unter Rückfluß erhitzt. Anschließend wird das Lösungsmittel im Wasserstrahlvakuum abdestilliert. Der Rückstand wird in 200 ml Essigester aufgeschlämmt und die Zweiphasensuspension mit 50 ml Wasser gewaschen. Die Wasserphase wird abgetrennt und die verbleibende Suspension filtriert. Der Hauptteil des Produkts wird aus dem Filterkinchen durch Umkristallisieren aus Aceton gewonnen. Das Filtrat wird im Wasserstrahlvakuum zur Trockne eingedampft. Durch Umkristallisieren aus Aceton wird weiteres Produkt gewonnen.
- 35    Ausbeute: 2,78 mg (5,5 mmol) 55 % d.Th.

40    DC: Kieselgel (Merck 60), Essigester/Hexan (v/v 1/2), Detektion über UV-Absorption

$$R_f = 0,55 \text{ N-(3-Brompropyl)phthalimid}$$

$$R_f = 0,44 \text{ (3-Phthalimidopropyl)malonsäuredimethylester}$$

$$R_f = 0,32 \text{ Bis-(3-phthalimidopropyl)malonsäuredimethylester}$$

45    4.2 5-Amino-2-(3-aminopropyl)pentansäure

- 50    1,0 g (2 mmol) Bis-(3-phthalimidopropyl)malonsäuredimethylester aus 4.1 werden in 40 ml Methanol gelöst und mit 10 ml 20 %iger methanolischer KOH (w/v) 15 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird mit 6 N Salzsäure angesäuert, ausgefallenes Kaliumchlorid wird abgetrennt und das Lösungsmittel im Wasserstrahlvakuum abdestilliert. Der Rückstand wird in 20 ml Mesitylen und 5 ml Eisessig suspendiert und 12 h unter Rückfluß erhitzt. Das Lösungsmittel wird im Hochvakuum abdestilliert, der Rückstand wird 16 h im Exsiccator über Kaliumhydroxid getrocknet. Das Rohprodukt wird in 10 ml Methanol gelöst und mit 5 ml Hydrazinhydrat mehrere Tage unter Rückfluß erhitzt. Das Lösungsmittel und Überschüssiges Hydrazinhydrat werden im Hochvakuum abdestilliert, der Rückstand wird mehrmals in Methanol gelöst und wieder im Hochvakuum eingeengt. Danach wird in 1 N Salzsäure dispergiert und vom Ungelösten abfiltriert. Aus der Mutterlauge wird das Produkt durch Kationenaustauschchromatographie (Dowex 50 x 2 - 200) gewonnen (Salzelution mit Wasser, Produktelution mit 1 N - 5 N Ammoniak). Ausbeute: 191 mg (1,1 mol) 55 % d.Th.

DC: Kieselgel 60, Wasser/s-Butanol/Eisessig/Essigester (v/v/v/v 1/1/1/1)

$R_f = 0.14$  5 Amino-2-(3-aminopropyl)pentansäure

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_6\text{-DMSO/TMS}$ ):  $\delta = 1.37$  (m, 8H, 4 $\text{CH}_2$ ); 2.22 (m, 1H,  $\text{CH-COO}$ ); 2.72 (m, 4H, 2 $\text{CH}_2\text{-N}$ ); 8.07 ppm (m, 6H, 2  $\text{N}^+\text{H}_3$ ).

5

#### 4.3 5-N-Maleinimido-2-(3-N-maleinimidopropyl)pentansäure

420 mg (2 mmol) 5-Amino-2-(3-aminopropyl)pentansäure-Hydrochlorid aus 4.2

in 15 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung werden mit 620 mg (4 mmol) Methoxycarbonylmaleinimid versetzt und unter Eiskühlung gerührt. Nach 3 h werden weitere 350 mg (2.25 mmol) Methoxycarbonylmaleinimid zugegeben und 2 h unter Eiskühlung gerührt. Anschließend stellt man mit 2 M Salzsäure auf pH 4 - 5 und lyophilisiert. Das Lyophilisat wird über präparative HPLC (Säule: Waters Delta-PAK™, C18, 50 X 300 mm, 300 Å, 15 µ, Eluent A: 0.01 % TFA, Eluent B: Acetonitril mit 0.01 TFA, Gradient: 0 % B nach 100 % B, Detektion bei 226 nm) gereinigt.

15 Ausbeute: 216 mg (0.65 mmol) 33 % d.Th.

DC: Kieselgel (Merck 60), n-Butanol/Eisessig/Wasser (v/v/v 3/1/1),

Detektion mit Kaliumpermanganat-Spray

$R_f = 0.16$  5-Amino-2-(3-aminopropyl)pentansäure

$R_f = 0.71$  5-N-Maleinimido-2-(3-N-maleinimidopropyl) pentansäure

20 Analytische HPLC: Säule: Vydac C18, 4.6 x 250 mm, 5 µ, 300 Å

Eluent: A: Millipore-Wasser, 0.01 % TFA

B: Acetonitril, 0.01 % TFA

Fluß: 1 ml/min

Gradient: 0 → 50 % B in 45 min

25 Detektion: 226 nm

Retentionszeiten:  $t = 33.3$  min 5-N-Maleinimido-2-(3-N-maleinimidopropyl)-pentansäure

$^1\text{H-NMR}$ ( $\text{CD}_3\text{OD/TMS}$ ):  $\delta = 1.51$  (m, 8H, 4 $\text{CH}_2$ ); 2.27 (m, 1H,  $\text{CH-COO}$ ); 3.48 (t,  $J = 6.7$  Hz, 4H, 2  $\text{CH}_2\text{-N}$ ); 6.91 ppm (s, 4H, 2  $\text{CH}=\text{CH}$ ).

30 4.4 5-N-Maleinimido-2-(3-N-maleinimidopropyl)-pentansäure-N-hydroxysuccinimid

200 mg (0.65 mmol) 5-N-Maleinimido-2-(3-N-maleinimidopropyl)-pentansäure werden in 5 ml Tetrahydrofuran gelöst, mit 88.6 mg (0.77 mmol) N-Hydroxysuccinimid und 159 mg (0.77 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid versetzt und 10 h bei 25 °C gerührt. Dann wird die Suspension mit 50 µl Essigsäure versetzt und 35 nach 1 h Rühren über eine Nutsche filtriert. Der abgetrennte Harnstoff wird kurz mit 1 ml Essigester nachgespült, das Filtrat eingeengt, über präp. HPLC (Bedingungen siehe unter 4.3) aufgereinigt und sofort lyophilisiert.

Ausbeute: 150 mg (0.35 mmol) 54 % d.Th.

Analytische HPLC: Säule: Vydac C18, 4.6 x 250 mm, 5 µ, 300 Å

40 Eluent: A: Millipore-Wasser, 0.01 % TFA

B: Acetonitril, 0.01 % TFA

Fluß: 1 ml/min

Gradient: 0 → 50 % B in 45 min

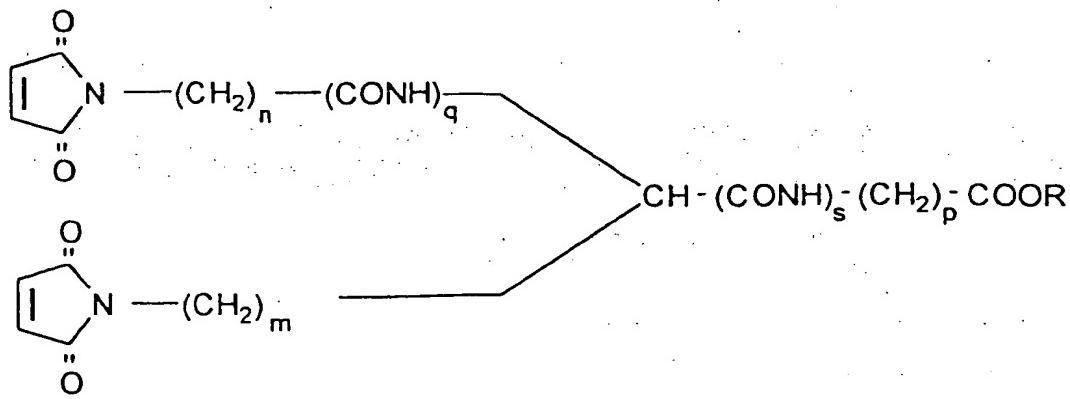
Detektion: 226 nm

45 Retentionszeiten:  $t = 33.3$  min 5-N-Maleinamido-2-(3-N-maleinimidopropyl)-pentansäure

$t = 39.0$  Min 5-N-Maleinimido-2-(3-N-maleinimidopropyl)-pentansäure-N-hydroxysuccinimid

#### Patentansprüche

50 1. Verbindung der allgemeinen Formel



in der R eine esteraktivierende Gruppe, m und n gleich oder verschieden und 0 - 6, q und s 0 oder 1, p = 0, wenn s = 0 ist und p = 2 - 4 wenn s = 1 ist, darstellen.

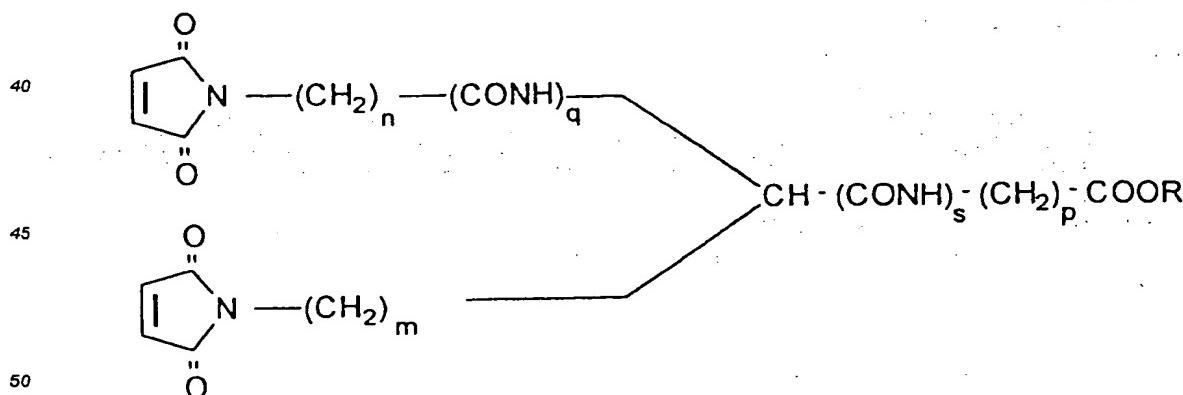
- 20 2. Verbindung nach Anspruch 1, in der  
R: Hydroxysuccinimidyl,  
n = 5, m = 4, p = 2 und q und s = 1 darstellen.

25 3. Verbindung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß R: Hydroxysuccinimidyl, n und m = 4, p  
und q und s = 0 darstellen.

4. Konjugat aus Haptene und einem Protein, gekoppelt über eine Verbindung gem. Anspruch 1, wobei  
die Haptene über die Maleinimidofunktionen dieser Verbindung und der Antikörper über Hydroxysucci-  
nidfunktion des Linkers gebunden sind.

30 5. Konjugat aus zwei ED-Untereinheiten von  $\beta$ -Galactosidase und einem Antikörper, bei dem die ED-  
Untereinheiten über zwei Maleinimidofunktionen der Verbindung nach Anspruch 1 und der Antikörper  
oder das Hapten über die Hydroxysuccinimidfunktion gebunden sind.

35 6. Verfahren zur Herstellung von Verbindungen der allgemeinen Formel,



in der R eine esteraktivierende Gruppe,

m und n gleich oder verschieden und  $0 \leq p = 0, q = 0$  oder 1 und  $s = 0$  darstellen durch

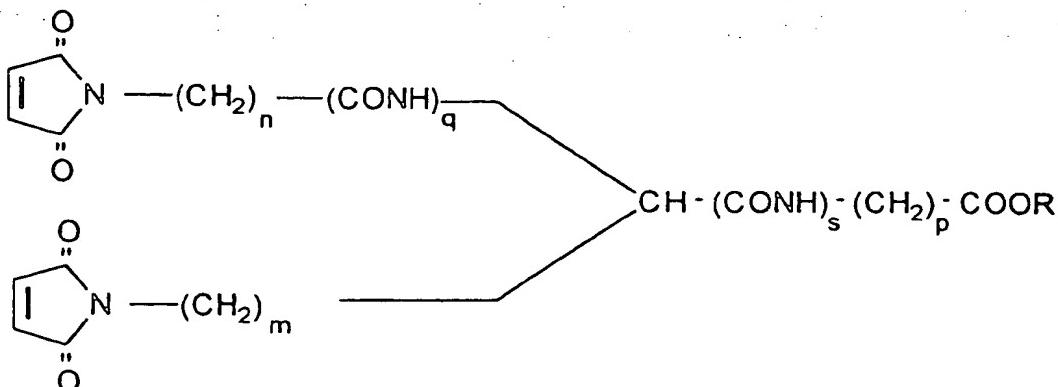
- 55 a) zweifache Malonestersynthese mit N-Phtalimidoalkylhalogenid an Malonsäurediester zu einem Dialkylmalonsäurediester  
b) Esterspaltung unter sauren Bedingungen und Descarboxylierung  
c) Saure Hydrolyse zur Freisetzung der Aminogruppen aus den N-Phtalimidoalkylgruppen

- d) Einführung von zwei Maleinimidylresten durch Behandlung mit Alkyloxycarbonylmaleinimid  
e) Aktivierung der Carboxyfunktion zu einem aktivierte Ester.

## 7. Verfahren zur Herstellung von Verbindungen der allgemeinen Formel,

5

10



15

20

in der R eine esteraktivierende Gruppe

- m und n gleich oder verschieden und  $0 - 6$   $p = 0$ ,  $q = 0$  und  $s = 0$  darstellen, durch  
a) zweifache Malonestersynthese mit N-Phtalimidoalkylhalogenid an Malonsäurediester zu einem  
Dialkylmalonsäurediester  
b) Esterspaltung unter sauren Bedingungen und Descarboxylierung  
c) Saure Hydrolyse zur Freisetzung der Aminogruppen aus den N-Phtalimidoalkylgruppen  
d) Einführung von zwei Maleinimidylresten durch Behandlung mit Alkyloxycarbonylmaleinimid  
e) Aktivierung der Carboxyfunktion zu einem aktivierte Ester.  
f) Umsetzung des aktivierten Esters mit einer  $\omega$ -Aminocarbonsäure und  
g) Aktivierung der Carboxyfunktion zu einem aktivierte Ester.

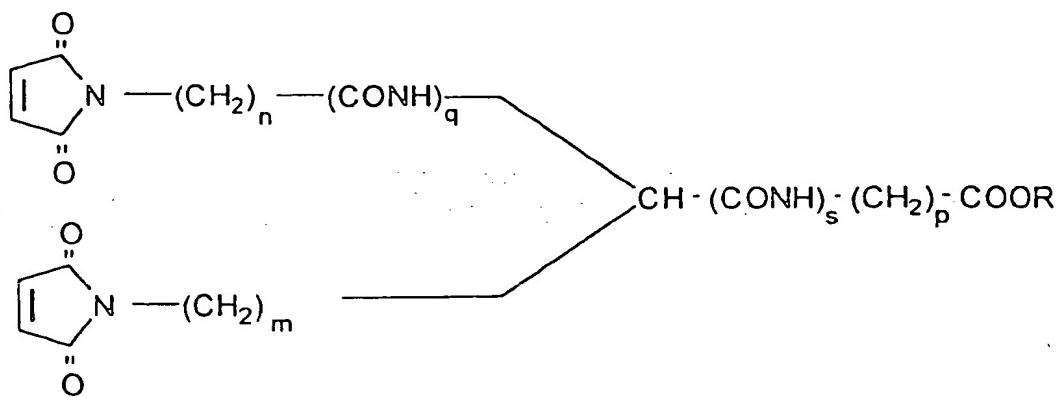
## 8. Verfahren zur Herstellung von Verbindungen der allgemeinen Formel

35

40

45

50



, in der R eine esteraktivierende Gruppe,

- m und n gleich oder verschieden und  $0 - 6$   $p = 0$ ,  $q = 1$  und  $s = 1$  darstellen durch  
a) Umsetzung einer Diaminosäure, in der eine der Aminofunktionen durch eine säurelabile Schutzgruppe geschützt ist, mit Alkoxy carbonylmaleinimid  
b) Umsetzung der freien Carboxygruppe mit einer Aminocarbonsäure  
c) Abspaltung der Schutzgruppe unter sauren Bedingungen  
d) Umsetzung der erhaltenen Verbindung mit einer carboxyaktivierte Maleinamidoalkansäure  
e) und Aktivierung der freien Carboxyfunktion zu einem aktivierte Ester.



Europäisches  
Patentamt

## EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EP 94 10 4676

### EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE

Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betreff Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.CLS)
D,A	EP-A-0 247 866 (MALLINCKRODT) 2. Dezember 1987 * das ganze Dokument * ---	1-5	C07D207/452 G01N33/53
D,A	EP-A-0 310 361 (BECKMAN INSTR) 5. April 1989 * das ganze Dokument * ---	1-5	
D,A	EP-A-0 446 071 (HYBRITECH INC) 11. September 1991 * das ganze Dokument * ---	1-5	
A	WO-A-92 22583 (CELLTECH UK) 23. Dezember 1992 * das ganze Dokument * * formulae 8,9 * ---	1-5	
A	DATABASE WPI Section Ch, Week 8537, Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 85-226374 & JP-A-60 146 154 (EISAI KK) 1. August 1985 * Zusammenfassung * -----	1-5	RECHERCHIERTE SACHGEBiete (Int. Cl.5)  C07D G01N
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchemort	Abschlußdatum der Recherche	Prüfer	
DEN HAAG	13. Juli 1994	Kissler, B	
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE			
X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet	T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze		
Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie	E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist		
A : technologischer Hintergrund	D : in der Anmeldung angeführtes Dokument		
O : nichtschriftliche Offenbarung	L : aus andern Gründen angeführtes Dokument		
P : Zwischenliteratur	& : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument		

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**